

Tie 2 表达载体的构建及其稳定转染 SKOV3 细胞系的建立[▲]

陈雅静¹ 许淑茹¹ 付达华¹ 许秀宽¹ 舒伟^{2*}

(¹ 福建漳州卫生职业学院科研科, 漳州市 363000; ² 广西医科大学细胞与遗传教研室, 南宁市 530021)

【摘要】 目的 构建人 Tie2 基因真核表达载体, 并建立稳定过表达 Tie2 基因的 SKOV3 细胞系。方法 采用 RT-PCR 方法从人肝癌细胞 BEL-7402 细胞系中扩增 Tie2 基因编码区 (cDNA), 将产物克隆至 pEGFP-N1 真核表达载体, 构建重组质粒 pEGFP-N1-Tie2 并测序鉴定。用构建成功的 pEGFP-N1-Tie2 真核表达载体转染人卵巢癌细胞 SKOV3, 经 G418 稳定筛选, 分离单克隆, 最后获得 Tie2 稳定表达的 SKOV3 细胞系, 并用实时荧光定量 PCR、Western Blot 方法鉴定构建结果。结果 成功构建 pEGFP-N1-Tie2 真核表达载体, 获得了稳定过表达人 Tie2 基因的 SKOV3 细胞株。结论 在 SKOV3 细胞系中稳定过表达人源 Tie2 基因, 为下一步研究 Tie2 基因的功能和应用奠定了基础。

【关键词】 人 Tie2 基因; 载体构建; 转染

【中图分类号】 Q 813.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-7768(2015)05-0604-04

DOI:10.16121/j.cnki.cn45-1347/r.2015.05.03

Construction of Eukaryotic Expression Vector and establishment of its Stably Transfected Cell line SKOV3

CHEN Ya-jing¹, XU Shu-ru¹, FU Da-hua¹, XU Xiu-kuan¹, SHU Wei^{2*}

(¹ Department of Scientific Research, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China;

² Department of Cell Biology and Genetics, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To construct the eukaryotic expression vector of human Tie2 and establish its stable transfected SKOV3 cell line. **Methods** The CDS of Tie2 was amplified from BEL-7402 cell line by RT-PCR and cloned into pEGFP-N1. The recombinant plasmid pEGFP-N1-Tie2 was sequenced. SKOV3 cells were transfected with pEGFP-N1-Tie2 and selected with G418 and then isolated monoclonal. The expression of Tie2 was identified by q-PCR and Western Blot. **Results** The eukaryotic expressing plasmid of pEGFP-N1-Tie2 was successfully constructed and Tie2 stably expressing SKOV3 cell line was established. **Conclusions** The recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-N1-Tie2 and the established SKOV3 cell line stably expressing Tie2 may be used for further study of Tie2 function.

【Key words】 Human Tie2; Construction of vector; Transfection

人类 Tie2 基因位于 9P21 区域, 编码含有 1124 个氨基酸的跨膜蛋白 TIE2, 分为胞外区、跨膜区和胞内激酶活性区, 属于酪氨酸激酶受体, 也称为内皮细胞特异表达的酪氨酸激酶 (endothelial-specific receptor tyrosine kinase, TEK)。Tie2 主要在血管内皮细胞和造血干细胞表面表达^[1-2]。近年来, 有学者发现人外周血及肿瘤组织中存在部分表达 Tie2 的单核细胞, 其在肿瘤新生血管中起重要的调控作用, 可能进一步参与肿瘤血管的发生、发展和成熟。

Tie2 基因在内皮细胞和造血干细胞以外的肿瘤细胞中表达是否提示其在肿瘤细胞的增殖或者其他细胞生物学功能以及肿瘤的发生发展中具有重要作用是一个值得研究的问题。为探究 Tie2 在肿瘤细胞发生发展过程中的作用, 我们通过构建过表达 Tie2 的真核载体并

转染人卵巢癌 SKOV3 细胞系, 筛选获得过表达 Tie2 的细胞系, 为后续研究该基因功能及其应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌种和载体 SKOV3 细胞系购自 ATCC, 培养方法参照 ATCC 培养说明。真核表达载体 pEGFP-N1 由广西医科大学细胞生物与遗传学教研室提供, 大肠埃希菌 DH5 α 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂 DNA 凝胶回收试剂盒购于 DONGSHENG BIOTECH 公司。限制性内切酶 XhoI 和 EcoRI、Pyrobest™ DNA Polymerase、T4 DNA Ligase 酶购于 TaKaRa 公司。SYBR Green qPCR SuperMix、Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司。Tie2、GAPDH 抗体购自 abcam 公司。RT-PCR 引物由 Invitrogen 合成。

1.2 方法

1.2.1 人 Tie2 cDNA 的获得 根据 Tie2 基因全序列设

[▲]基金项目: 漳州市科技局自然科学基金项目 (ZZ2012J22、ZZ2013J15); 福建省卫生厅青年科研课题 (2012-1-40); 国家自然科学基金项目 (81260479)

* 通讯作者

计上下游引物,上游引物:5'CCGCTCGAG GCCACC ATG-GACTCTTTAGCCAGCTTAG 3';下游引物:5'CCGGAATTC GGGCCGCTTCTTCAGCAGAACAG 3'。提取人 BEL-7402 细胞总 RNA,进行 RT-PCR,反应体系为 25 μ L:dNTP mixture 2 μ L,10 \times Pyrobest buffer 2.5 μ L,模板 cDNA(逆转录获取)2.5 μ L,上下游引物各 2.5 μ L,PyrobestTM DNA Polymerase 0.3 μ L,ddH₂O 14.7 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,32 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,然后 16 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化。

1.2.3 构建 Tie2-pEGFP-N1 重组质粒 运用限制性内切酶 XhoI 与 EcoRI 分别对回收产物及 pEGFP-N1 载体进行酶切纯化回收,酶切回收的 PCR 产物(Tie2)与酶切回收的 pEGFP-N1 载体于 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h,将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,于涂布 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板培养。筛选 11 个阳性菌落,提取重组质粒进行酶切鉴定,同时送交英俊公司进行测序。

1.2.4 转染细胞系 (1)SKOV3 细胞 G418 最小致死剂量筛选:96 孔板接种 SKOV3 细胞,细胞密度为 80%,贴壁 24 h 后,分别加入含浓度为 0 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、300 μ g/mL、400 μ g/mL、500 μ g/mL、600 μ g/mL、700 μ g/mL、800 μ g/mL、900 μ g/mL、1 000 μ g/mL 的 G418 培养基中,每个浓度 6 个平行孔。观察 1 周,中间换培养液 1 次。根据细胞的存活率,最终选择 600 μ g/mL 的 G418 浓度为筛选浓度。(2)转染细胞:培养好的 SKOV3 细胞接种于 24 孔板,以密度 1×10^5 个/孔种细胞,充分摇匀。第 2 天细胞融合度为 80% 时,进行转染。取 1 μ g 质粒溶于 150 μ L opti-MEM 中混匀于 A 管静置,将 3 μ L lipo 2 000 加入 150 μ L opti-MEM 中轻轻混匀于 B 管静置 5 min,将 A 管和 B 管混合,混匀后静置 20 min 分别加入各细胞孔,混匀,放入细胞培养箱 4~6 h,吸去转染培养基,再用 PBS 漂洗两次,每个细胞孔加入 2 mL 完全培养基。(3)G418 筛选 SKOV3 细胞:细胞培养后的第 3 天,于每个细胞孔中加

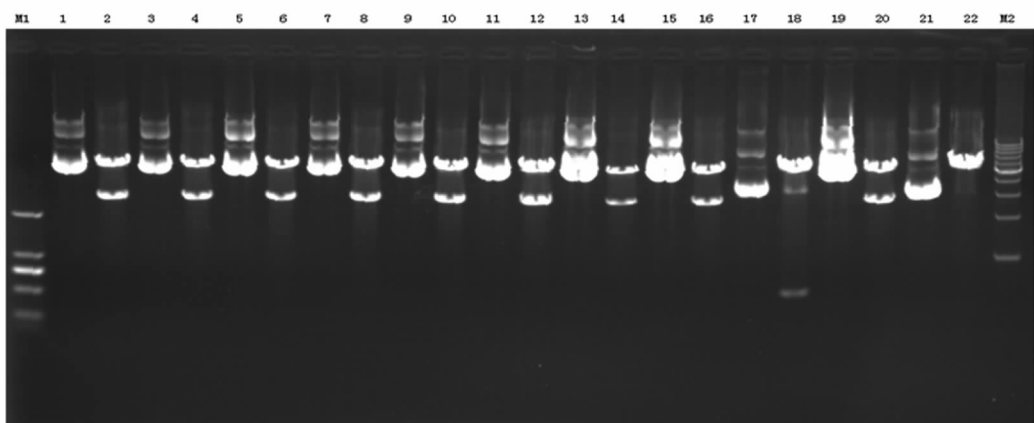
入浓度为 600 μ g/mL 的 G418 培养基。中间换 1 次液,1 周后在倒置显微镜下观察结果,在细胞培养板上用标记笔圈出每一个细胞群。用 0.25% 胰酶消化细胞群,每一团细胞收集到新的 24 孔板用浓度为 600 μ g/mL 的 G418 培养基培养 1 周后再用倒置显微镜观察培养结果,挑选出正常生长的细胞群进行传代。用浓度为 200 μ g/mL 的 G418 培养基稳定培养 1 个月。

1.2.5 q-PCR 检测稳定细胞系 Tie2 表达 收集稳定转染细胞系 RNA,进行逆转录获得 cDNA,进行定量 PCR。Tie2 上游引物:5'GAGAGGCAATCAGGATACGAAC 3';Tie2 下游引物:5'GGCAGGTGTACTTCTAGAATATC 3'。18srRNA-F:5'CCTGGATACCGCAGCTAGGA;18srRNA-R:5'GCGGCGCAATACGAATGCCCC。反应体系共 20 μ L:cDNA 5 μ L,上游引物 0.5 μ L,下游引物 0.5 μ L,2x SYBR Green qPCR SuperMix 10 μ L,ddH₂O 4 μ L。反应条件:50 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 32 s 读板,40 cycles;融解曲线分析:温度 60 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C。每个样品重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测稳定细胞系 Tie2 表达 收集已转染的 SKOV3 细胞,用 PBS 漂洗后加入 RIPA 裂解细胞,BCA 法测定蛋白浓度。测定好后加热变性、采用 SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转移蛋白,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,加入合适的一抗稀释液于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,二抗稀释液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min,最后采用 ECL 试剂暗盒显影,观察结果。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 pEGFP-N1-Tie2 真核表达载体经 EcoRI 和 XbaI 双酶切,电泳显示酶切结果均为阳性克隆,见 2、4、6、8、10、12、14、16、20 泳道,选取泳道 2 质粒的样本进行测序。



M1:DL2000 DNA Marker; M2:DL1kb DNA Marker(1000-10000)

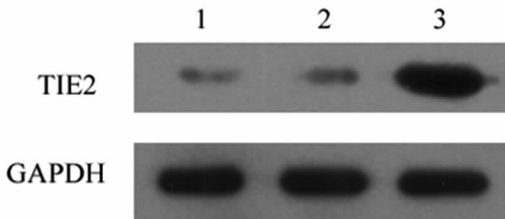
图1 pEGFP-N1-Tie2 重组质粒双酶切鉴定结果

2.2 重组质粒的序列测定 Tie2 基因已成功克隆至过表达载体 pEGFP-N1 中,通过 BLAST 比对发现在 1740 个碱基处有突变,AGA 突变为 AGG;2094 个碱基处 CAG 突变为 CAA;但经过分析发现 AGA 与 AGG 均编码精氨酸,CAG 与 CAA 均编码谷氨酰胺,氨基酸序列并没有改变,不会对蛋白造成影响;即此次构建的 Tie-2 可以用于后续过表达实验。

表 1 实时荧光定量 PCR 的 Ct 值

组别	样品	重复 1	重复 2	重复 3	Ct 平均值	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Tie2 扩增	SKOV3	29.0629	29.212	29.254	29.18 ± 0.1	20.55 ± 0.08	0 ± 0.08	1 ± 0.06
	SKOV3-pEGFP-N1	29.1743	29.397	29.176	29.25 ± 0.13	20.25 ± 0.14	-0.3 ± 0.14	1.23 ± 0.12
	SKOV3-pEGFP-N1-Tie2	24.0757	24.077	24.114	24.09 ± 0.02	14.46 ± 0.08	-6.09 ± 0.08	67.95 ± 3.72
18S 扩增	SKOV3	8.6114	8.6308	8.6424	8.63 ± 0.02	-	-	-
	SKOV3-pEGFP-N1	9.0105	8.985	9.0001	9 ± 0.01	-	-	-
	SKOV3-pEGFP-N1-Tie2	9.5313	9.6172	9.7276	9.63 ± 0	-	-	-

2.4 重组质粒的 Western blot 鉴定 利用 Western blot 技术,以 GAPDH 为内参,检测转染 pEGFP-N1-Tie2 的 SKOV3 细胞 Tie2 的表达。未经处理的 SKOV3 细胞系有少量 Tie2 表达,但在转染 pEGFP-N1-Tie2 后 Tie2 表达量明显增高。见图 2。



1:SKOV3;2:SKOV3-pEGFP-N1;3 SKOV3-pEGFP-N1-Tie2
图 2 Western blot 检测不同细胞系中 Tie2 蛋白表达情况

3 讨论

Tie2 基因编码的跨膜蛋白 TIE2,与其配体促血管生产素(angiotensins, ANGPT)通过信号转导途径在血管的发展和成熟中发挥着重要的调节作用。正常生理状态下,ANGPT1 结合 TIE2 受体,诱导其磷酸化,从而激活 TIE2 受体,促进血管生成、维持血管完整稳定。Tie2 基因不仅在内皮细胞和造血干细胞中表达,在一些宫颈癌、肺腺癌以及骨肉瘤等多种肿瘤细胞中也有表达,并参与肿瘤微环境中血管的发展和成熟。

Venneri 等^[3-4]在小鼠和人类的肾脏、结肠、胰腺、肺以及软组织恶性肿瘤等多种肿瘤中,均发现肿瘤血管和缺氧区域存在表达 Tie2 基因的单核细胞(TEMs),而在肿瘤周围的正常组织中没有发现表达 Tie2 基因的单核

2.3 重组质粒的实时荧光定量 PCR 鉴定 实时荧光定量 PCR 检测稳定细胞系 Tie2 表达情况,实验分为三组进行检测:SKOV3 细胞组、SKOV3-pEGFP-N1 空载组以及 SKOV3-pEGFP-N1-Tie2 稳定细胞系组,并以 18srRNA 为内参。结果显示 SKOV3-pEGFP-N1-Tie2 稳定细胞系组中 Tie2 表达量与 SKOV3 细胞组相比,mRNA 水平升高 60 多倍,差异有统计学意义($t=0.001, p=0.001$)。见表 1。

细胞。研究结果显示,在直肠癌、口腔鳞癌、膀胱癌上皮组织均发现 Tie2 表达上调^[5-7];在宫颈癌 Hela、肺腺 SPC-A1、骨肉瘤 U2OS 及肝癌 BEL-7402 细胞系中发现 Tie2 的 mRNA 和蛋白质水平都有不同程度的表达^[8]。Tie2 基因在肿瘤细胞中的表达的细胞生物学功能及其对肿瘤发生发展的意义有待进一步研究。本实验构建了 Tie2 真核表达载体并筛选其稳定转染的 SKOV3 细胞系进行研究,观察 Tie2 在肿瘤细胞发生发展中的作用。结果显示本实验成功构建了 pEGFP-N1-Tie2 真核表达载体,获得了稳定过表达人 Tie2 基因的 SKOV3 细胞株。

目前国内有关 Tie2 的研究大多数针对肿瘤组织^[9-10],重点研究 Tie2 在肿瘤血管形成过程中的作用^[11-12]。本实验采用肿瘤细胞系对 Tie2 进行研究,从细胞水平上独立研究 Tie2,可除去组织内血管内皮细胞表达 Tie2 对实验的干扰;并且实验采用 pEGFP-N1 绿色荧光蛋白表达载体,在荧光显微镜下可观察到绿色荧光,借此可以确定外源基因在细胞内的表达或组织中的定位,并且直接观察稳定转染的情况,作为质量控制的方法之一。

人 Tie2 表达载体及稳定过表达 Tie2 的 SKOV3 细胞系的成功构建,为进一步研究该基因对肿瘤细胞在增殖、凋亡、侵袭转移能力等方面的影响及其在促进肿瘤发生发展过程中的主要分子机制奠定了研究基础。

参 考 文 献

- [1] Jones N, Iljin K, Dumont DJ, et al. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(4): 257-267.

(下转第 676 页)

理压力具有重要意义。可见,影响癌症患者生活质量的因素比较复杂,具有多样性的特点^[12]。

综上所述,为了有效提高肝癌患者的生活质量,首先,医护人员、家庭成员以及亲戚朋友等应加强对肝癌患者的关心和爱护,并给予患者个体化的心理疏导,缓解患者的负性情绪;其次,对于家庭条件差以及缺乏家属照顾的患者,医护人员应加强对患者的照顾和生活护理,以最大限度消除患者躯体症状,缓解患者疲劳程度。与此同时,医护人员还应为患者寻找更多的社会支持渠道;各级医院也应积极推动医疗保险制度的完善,努力促使癌症基金的成立,使肝癌患者走出经济困境,提高生活质量。

参 考 文 献

- [1] 祝葆华,万崇华,王坤. FLIC、SF-36 和 QOL-LC 量表在肝癌患者生活质量测定中的应用比较[J]. 中国循证医学杂志,2012,12(10):1175-1179.
 - [2] Gao LB, Tian H, Wang XG, et al. Early enteral and parenteral nutritional support after hepatectomy in patients with hepatic carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *OncoTargets and therapy*, 2015, 8(8):623-631.
 - [3] Xiao-Wen, Ge Hai-Ying, Zeng Akesu, et al. Hepatocellular carcinoma with concomitant hepatic angiomyolipoma and cavernous hemangioma in one patient[J]. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2015, 21(11):3414-3419.
 - [4] 刘香艳,曹文婷,王毅欣. 肝癌患者生活质量测评工具及应用[J]. 肿瘤,2011,31(4):374-378.
 - [5] Benedicta Von Mallinckrodt, Mayank Thakur, Roger Gilbert-Oriol, et al. P7. 03Dianthin-EGF; a leading candidate in combination therapy with saponins in the field of colon carcinoma[J]. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO*, 2015, 26(12):ii31.
 - [6] 朱建军,刘英,赵桐,等. EORTC QLQ-C30 量表在肝癌患者生活质量评价中的应用[J]. 河北医药,2014,36(24):3740-3742.
 - [7] 李玲,程云,陈莺. 认知行为干预对肝癌患者负性情绪及生活质量的影响[J]. 国际护理学杂志,2015,34(1):75-77.
 - [8] 乔翠云,王海龙,兰桂云. 行为动力干预对肝癌介入治疗患者心理行为矛盾及生活质量的影响[J]. 介入放射学杂志,2014,23(2):172-174.
 - [9] 黄彩群. 肝癌晚期患者心理疏导与社会支持[C]. 2014 现代护理论坛,2014:20-21.
 - [10] Xu DW, Long XD, Xia Q. A review of life quality in living donors after liver transplantation[J]. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015, 8(1):20-26.
 - [11] 于海鹏,郭志,邢文阁. CT 引导下经皮穿刺氩氦冷冻治疗对老年原发性巨块型肝癌患者生活质量的影响[J]. 中国老年学杂志,2011,31(8):1287-1289.
 - [12] 胡文雷,徐焕海. 扶正补虚方对原发性肝癌患者细胞免疫功能及生活质量的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2014,(8):444-446,450.
- (收稿日期:2015-07-06 修回日期:2015-09-13)
-
- (上接第 606 页)
- [2] Arain F, Hirao A, Ohumra M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche [J]. *Cell*, 2004, 118(2):149-161.
 - [3] Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer [J]. *Blood*, 2007, 109(12):5276-5285.
 - [4] De Palma M, Mazzieri R, Politi LS, et al. Tumor-targeted interferon- α delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(4):299-311.
 - [5] 王康,尚卫华,贾蓬勃,等. 血管生成素受体 Tie2 在直肠癌中的表达及作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2006, 27(6):599-601.
 - [6] 冀洪海,杨勇,胥欣,等. Tie2 受体在口腔鳞癌中的表达[J]. 口腔颌面外科杂志,2008,18(6):386-389.
 - [7] 文进,李汉忠,纪志刚,等. 膀胱癌受体酪氨酸激酶基因及蛋白的表达[J]. 中国医学科学院学报,2011,33(4):393-396.
 - [8] 吴向华,覃文新,赵瑞胶,等. 酪氨酸激酶受体 Tie2 在不同肿瘤中的表达及其意义[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(5):836-839.
 - [9] 王恺越,郭斐斐,凌静娴,等. Tie-2 基因表达与子宫内膜癌生物学行为的关系[J]. 现代医学,2014,42(6):670-674.
 - [10] 王瑞华,谢建国,付强,等. 结直肠癌组织中 Ang-2、Tie2 mRNA 的表达及 K-ras 基因突变的检测[J]. 郑州大学学报(医学版), 2013, 48(5):629-632.
 - [11] 王超群,贺轶锋,余耀. Tie2 阳性表达的单核细胞在肿瘤血管生成中的作用[J]. 中国临床医学,2012,19(6):708-709.
 - [12] 吴丽,王凯,王昕婧,等. Tie2 基因过表达对单核细胞功能的影响[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(2):156-161.
- (收稿日期:2015-06-18 修回日期:2015-8-14)